

29. 6. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

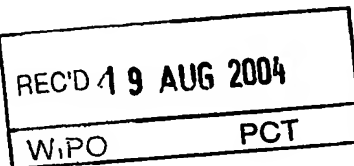
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 6 月 1 3 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 6 9 7 1 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 6 9 7 1 4]

出 願 人
Applicant(s):

国立長寿医療センター総長
独立行政法人医薬品医療機器総合機構

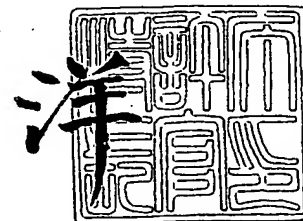


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 8 月 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 14213601

【提出日】 平成15年 6月13日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/63

【発明の名称】 アルツハイマー病の治療のための組換えアデノ随伴ウイルスベクター

【請求項の数】 16

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県大府市森岡町源吾 3 6 の 3 国立療養所中部病院
 長寿医療研究センター内

 【氏名】 田 平 武

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県大府市森岡町源吾 3 6 の 3 国立療養所中部病院
 長寿医療研究センター内

 【氏名】 原 英 夫

【特許出願人】

 【識別番号】 501304319

 【住所又は居所】 愛知県大府市森岡町源吾 3 6 の 3

 【氏名又は名称】 国立療養所中部病院長 太 田 壽 城

【特許出願人】

 【識別番号】 598004952

 【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 3 丁目 3 番 2 号 新霞が関ビル 9
 階

 【氏名又は名称】 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構

【代理人】

 【識別番号】 100075812

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 吉 武 賢 次

【選任した代理人】

【識別番号】 100091487

【弁理士】

【氏名又は名称】 中 村 行 孝

【選任した代理人】

【識別番号】 100094640

【弁理士】

【氏名又は名称】 紺 野 昭 男

【選任した代理人】

【識別番号】 100107342

【弁理士】

【氏名又は名称】 横 田 修 孝

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 087654

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アルツハイマー病の治療のための組換えアデノ随伴ウイルスベクター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

β アミロイドペプチドの液性免疫惹起部位を含むペプチド断片を発現しうるアデノ随伴ウイルスベクターであって、該ペプチド断片をコードする DNA を機能しうる形で含んでなる、アデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 2】

前記ペプチド断片が、 β アミロイドペプチドの第 4 ～ 10 アミノ酸を含んでなるものである、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 3】

前記ペプチド断片が、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列中の第 4 ～ 10 アミノ酸を含んでなるものである、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 4】

前記ペプチド断片をコードする DNA が、配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列中の第 10 ～ 30 ヌクレオチドを含んでなるものである、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 5】

前記ペプチド断片が、 β アミロイドペプチドの第 1 ～ 43 アミノ酸を含んでなるものである、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 6】

前記ペプチド断片が、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含んでなるものである、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 7】

前記ペプチド断片をコードする DNA が、配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 8】

前記ペプチド断片が、 β アミロイドペプチドの第 1 ～ 21 アミノ酸を含んでな

るものである、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 9】

前記ペプチド断片が、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含んでなるものである、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 10】

前記ペプチド断片をコードする DNA が、配列番号 3 で表されるヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 11】

前記ペプチド断片を細胞外に分泌させることができるシグナルペプチドをコードする DNA を、機能しうる形でさらに含んでなる、請求項 1 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 12】

前記シグナルペプチドが、アミロイド前駆体タンパク質のシグナルペプチドである、請求項 11 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 13】

前記シグナルペプチドが、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含んでなるものである、請求項 11 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 14】

前記シグナルペプチドをコードする DNA が、配列番号 5 で表されるヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項 11 に記載のアデノ随伴ウイルスベクター。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載のアデノ随伴ウイルスベクターを含んでなる、アルツハイマー病を治療するための医薬組成物。

【請求項 16】

経口投与のための、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、アルツハイマー病に対して用いることが可能な A β ペプチドを発現するアデノ随伴ウイルスベクターおよびその医薬品としての使用に関する。

【0002】

背景技術

アルツハイマー病は、脳における老人斑、神経原繊維変化、ならびに神経細胞の変化および脱落により特徴づけられる。特に老人斑に沈着する β アミロイドは、アルツハイマー病の病態形成の中心的役割を果たしていると考えられている。この β アミロイド体の主成分である β アミロイドペプチド (A β) は、神経細胞内の β -アミロイド前駆体タンパク質 (β APP) が β , γ -分泌酵素によって部分的に分解されることにより生成される。

【0003】

近年、家族型アルツハイマー病変異を有するヒトアミロイド前駆体タンパク質を強発現するトランスジェニックマウスに対し、アジュバントと共に A β ペプチドを免疫投与することによって、老人斑の形成が抑制され、既に形成されている老人斑も減少することが報告されている (非特許文献1: Schenk D, Barbour R, Dunn W et al: Nature 400:173-177, 1999)。

【0004】

上記作用の機序としては、現在3つの説がある。第一の説は、A β ペプチドを投与し A β に対する抗体を体内で産生させ、老人斑の中の凝集した A β に抗体が結合し、それをミクログリアが貪食することにより、老人斑が除去され、分泌された A β にも抗体が結合してミクログリアが貪食し、A β の神経細胞への毒性を抑え、痴呆の改善などの治療に結びつくという説である。第二の説は、A β ペプチドを投与することによって A β に対して産生された抗体は、A β のN末端のアミノ酸を認識して結合し、凝集・不溶化した A β を可溶化し、さらに分泌された A β の凝集・沈着を抑制することにより、アミロイド沈着を減少させるという説である。第三の説は、A β に対する抗体は、血液脳関門を越えず、末梢血・末梢組織において A β を減少させることにより、中枢神経系から A β を末梢に引き出すという sink 説である。

【0005】

上記の仮説に基づき、ウィルスベクターを用いたアルツハイマー病の予防法および治療法の開発も試みられている。例えば、アデノウィルスベクターに $A\beta$ cDNA を組み込み、C57BL/6 マウスに経口投与することによって、マウス上部消化管組織に $A\beta$ を発現させることが可能であり、さらに、このマウスの血清中の抗 $A\beta$ 抗体は、in vitro において $A\beta$ ペプチドの凝集を阻害することが報告されている（非特許文献 2：田平 武、原 英夫著、平成 13 年度 厚生化学研究「21 世紀型医療開拓推進研究（痴呆分野）研究成果発表報告書」、財団法人 長寿科学振興財団出版、平成 14 年 3 月、p. 49-54）。しかし、この報告では、in vivo 実験は行われておらず、動物における治療効果は確認されていない。

【0006】

アルツハイマー病の治療剤には、中枢神経系での老人斑の形成およびアミロイドの沈着を抑制することが必要とされ、同時に、多臓器への拡散がないこと、脳炎などの副作用を起こさないことなど、安全性も求められる。しかし、これらの条件を満たす、 $A\beta$ 抗原を利用した治療剤は、これまで報告されていない。

【0007】

【非特許文献 1】

Schenk D, Barbour R, Dunn W et al: Nature 400:173-177, 1999

【非特許文献 2】

田平 武、原 英夫著、平成 13 年度 厚生化学研究「21 世紀型医療開拓推進研究（痴呆分野）研究成果発表報告書」、財団法人 長寿科学振興財団出版、平成 14 年 3 月、p. 49-54

【0008】

【発明の概要】

本発明者らは、今般、組換えアデノ随伴ウィルスを用いて、液性免疫を惹起させる $A\beta$ 抗原を腸管細胞に発現させ、この $A\beta$ 抗原に対する抗体産生を誘導することにより、脳においてアミロイド沈着および老人斑形成が減少することを見出した。さらに、本発明者らは、この組換えアデノ随伴ウィルスを用いると、脳お

よび腎臓などの他臓器に炎症所見が認められないことを見出した。本発明はこれらの知見に基づくものである。

【0009】

従って、本発明は、アルツハイマー病の治療に用いることのできる、 $A\beta$ 抗原を発現するアデノ随伴ウイルスベクターおよびこれを含む医薬組成物の提供を目的とする。

【0010】

そして、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、 β アミロイドペプチドの液性免疫惹起部位を含むペプチド断片を発現しうるアデノ随伴ウイルスベクターであって、このペプチド断片をコードする DNA を機能しうる形で含んでなる、ものである。

【0011】

さらに、本発明による医薬組成物は、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターを含んでなる、アルツハイマー病を治療するための医薬組成物である。

【0012】

本発明によれば、組換えアデノ随伴ウイルスベクターを利用して、細胞性免疫を惹起せずに抗体産生を誘導することができ、中枢神経系での老人斑の形成およびアミロイドの沈着を抑制できる。さらに、本発明による組換えアデノ随伴ウイルスベクターによれば、脳炎、肝障害等の副作用を起こさない安全性の高いアルツハイマー病の治療が可能となる。

【0013】

【発明の具体的説明】

本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、 β アミロイドペプチド ($A\beta$ ペプチド) の液性免疫惹起部位を含むペプチド断片をコードする DNA を、機能しうる形で含んでなり、これにより該ペプチド断片を発現することができる。ここで「機能しうる形で含んでなる」とは、適切な調節エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーターなど) の制御下に、導入遺伝子 (DNA) の発現を可能にする様式で、そのベクター中に該導入遺伝子が挿入されていることを意味する。

【0014】

A β ペプチドの液性免疫惹起部位は、当業者であれば容易に特定することができる。例えば、前記液性免疫惹起部位はA β ペプチドの第4～10アミノ酸（A β 4-10）の領域中に存在する。よって、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターによって発現される前記抗原ペプチド断片は、A β 4-10を含んでなることが好ましい。

【0015】

また、A β 4-10のアミノ酸配列としては、配列番号2で表されるアミノ酸配列中の第4～10アミノ酸が挙げられる。従って、前記抗原ペプチド断片は、配列番号2で表されるアミノ酸配列中の第4～10アミノ酸を含んでなることが好ましい。このアミノ酸配列をコードするDNAのヌクレオチド配列は特に制限されるものではないが、例えば、配列番号1で表されるヌクレオチド配列中の第10～30ヌクレオチドが挙げられる。従って、前記抗原ペプチド断片をコードするDNAは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列中の第10～30ヌクレオチドを含んでなることが好ましい。

【0016】

本発明の好ましい実施態様によれば、前記抗原ペプチド断片は、A β ペプチドの第1～43アミノ酸（A β 1-43）を含んでなるものとされる。A β 1-43のアミノ酸配列としては、配列番号2で表されるアミノ酸配列が挙げられ、従って、前記抗原ペプチド断片は、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含んでなることが好ましい。このアミノ酸配列をコードするDNAのヌクレオチド配列は特に制限されるものではないが、例えば、配列番号1で表されるヌクレオチド配列が挙げられ、従って、前記抗原ペプチド断片をコードするDNAは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を含んでなることが好ましい。

【0017】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、前記抗原ペプチド断片は、A β ペプチドの第1～21アミノ酸（A β 1-21）を含んでなるものとされる。A β 1-21のアミノ酸配列としては、配列番号4で表されるアミノ酸配列が挙げられ、従って、前記抗原ペプチド断片は、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含ん

でなることが好ましい。このアミノ酸配列をコードするDNAのヌクレオチド配列は特に制限されるものではないが、例えば、配列番号3で表されるヌクレオチド配列が挙げられ、従って、前記抗原ペプチド断片をコードするDNAは、配列番号3で表されるヌクレオチド配列を含んでなることが好ましい。

【0018】

前記A β 1-43およびA β 1-21のアミノ酸配列には、液性免疫惹起部位のみならず、T細胞受容体認識配列も含まれるが、本発明によるアデノ随伴ウィルスベクターによって腸管粘膜免疫系にこれら抗原ペプチド断片を発現させた場合、主に抗体産生を誘導し、細胞性免疫はほとんど惹起しない。

【0019】

本発明によるアデノ随伴ウィルスベクターによって発現された前記抗原ペプチド断片を抗原として効率よく提示するためには、感染細胞内での発現の後に、該抗原ペプチド断片が細胞外に分泌されることが好ましい。従って、本発明によるアデノ随伴ウィルスベクターは、好ましくは、発現された前記抗原ペプチド断片を細胞外に分泌させることができるシグナルペプチドをコードするDNAを、機能しうる形で含んでなるものとされる。ここで「機能しうる形で含んでなる」とは、前記シグナルペプチドが前記抗原ペプチド断片とともに発現され、かつ、発現された前記抗原ペプチド断片が前記シグナルペプチドによって細胞外に分泌されることを意味する。前記シグナルペプチドをコードするDNAを機能しうる形で本発明によるアデノ随伴ウィルスベクターに組み込む方法としては、当業者に公知のものを用いることができるが、例えば、前記抗原ペプチド断片のN末端に結合した形で前記シグナルペプチドが発現するように、それぞれのDNAを融合させた融合遺伝子を用いることができる。

【0020】

前記シグナルペプチドとしては、当業者に公知のものを用いることができるが、好ましくはアミロイド前駆体タンパク質（APP）のN末端に存在するシグナルペプチドが用いられる。APPシグナルペプチドのアミノ酸配列としては配列番号6で表されるアミノ酸配列が挙げられ、よって、本発明によるアデノ随伴ウィルスベクターにより発現される前記シグナルペプチドは、配列番号6で表され

るアミノ酸配列を含んでなるものであることが好ましい。このアミノ酸配列をコードするDNAのヌクレオチド配列は特に制限されるものではないが、例えば、配列番号5で表されるヌクレオチド配列が挙げられ、従って、前記シグナルペプチドをコードするDNAは、配列番号5で表されるヌクレオチド配列を含んでなることが好ましい。

【0021】

本発明の好ましい実施態様によれば、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、APPシグナルペプチドがAβ1-43のN末端に連結した融合タンパク質をコードするDNAを含んでなるものとされる。この融合タンパク質のアミノ酸配列としては、配列番号8で表されるアミノ酸配列が挙げられ、これをコードするDNAのヌクレオチド配列としては、配列番号7で表されるヌクレオチド配列中の第9～191ヌクレオチドが挙げられる。

【0022】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、APPシグナルペプチドがAβ1-21のN末端に連結した融合タンパク質をコードするDNAを含んでなるものとされる。この融合タンパク質のアミノ酸配列としては、配列番号10で表されるアミノ酸配列が挙げられ、これをコードするDNAのヌクレオチド配列としては、配列番号9で表されるヌクレオチド配列中の第17～133ヌクレオチドが挙げられる。

【0023】

さらに、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、目的のDNAを効率よく発現させるための調節エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーターなどを含んでいてもよく、必要に応じて、翻訳開始コドン、翻訳終止コドンなどを挿入してもよい。

【0024】

本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、当技術分野で周知となっている標準的方法により調製することができる。例えば、米国特許第5,858,351号およびそこに引用される参考文献には、遺伝子治療における使用に適切な種々の組換えアデノ随伴ウイルス、ならびにそれらのベクターの作製方法および増

殖方法が記載されている（例えば、Kotin(1994)Human Gene Therapy 5:793～801、またはBerns「Parvoviridae and their Replication」Fundamental Virology、第2版、Fields&Knipe編など）。

【0025】

アデノ随伴ウイルスベクターを作製するための好ましい方法によれば、まず、野生型アデノ随伴ウイルスの両端の I T Rを残し、その間に目的の遺伝子を挿入することによりプラスミドを作製する（AAVベクタープラスミド）。一方、R e p 遺伝子（複製蛋白をコードする遺伝子）およびC a p 遺伝子（ウイルスの頭殻蛋白をコードする遺伝子）を発現するプラスミド、ならびにアデノウイルス遺伝子であるE 2 A、E 4、およびV Aの各遺伝子を発現するプラスミドを用意する。次いで、これら3種のプラスミドを、E 1 遺伝子を発現するパッケージング細胞、例えばH E K 2 9 3細胞に同時トランスフェクションし、この細胞を培養する。これにより、哺乳動物細胞対して高い感染能力を持つアデノ随伴ウイルスベクター粒子を産生することができる。このような方法は、AAV-H e l p e r - F r e e S y s t e m (Stratagene) などの市販のキットを用いて容易に行なうことができる。

【0026】

本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、哺乳動物のアルツハイマー病の治療に用いることができる。従って、本発明によれば、治療上有効量の本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターを被験者に投与することを含んでなる、アルツハイマー病の治療方法、ならびにアルツハイマー病の治療剤の製造における、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターの使用が提供される。ここで、「治療」には、確立された病態を治療することだけでなく、将来確立される可能性のある病態を予防することをも含む。前記被験者は哺乳動物、例えば、げっ歯類、イヌ、ネコ、ウシ、霊長類などとされ、好ましくはヒトとされる。

【0027】

本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターの投与方法は、遺伝子治療の分野において使用可能な方法、例えば、腹腔内注入、気管内注入、気管支内注入および直接的な気管支内滴注、皮下注入、経皮輸送、動脈内注入、静脈内注入等 (Flot

teおよびCarter, Gene Therapy 2:357-362(1995)参照)とされる。さらに、アデノ随伴ウイルスは、胃液によって分解されにくいため、経口投与できるという利点を有する。また、経口投与は、被験者が自ら投与することができるという点で、特に好ましい。

【0028】

投与されるアデノ随伴ウイルスベクターの量は治療上有効量であればよく、このような量は遺伝子治療分野の当業者であれば容易に決定することができる。また、投与量は、被験者の病態の重篤度、性別、年齢、体重、習慣等によって調整することが好ましいが、このような投与量の調整は、医師または獣医によって適宜行なわれる。例えば、経口投与されるアデノ随伴ウイルスベクターの量は、通常 $0.5 \times 10^{11} \sim 2.0 \times 10^{12}$ viral genome/体重kgであり、好ましくは $1.0 \times 10^{11} \sim 1.0 \times 10^{12}$ viral genome/体重kg、より好ましくは $1.0 \times 10^{11} \sim 5.0 \times 10^{11}$ viral genome/体重kgとされる。本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは上記の投与量の範囲内において、医薬上安全である。ここで、「viral genome」という単位は、アデノ随伴ウイルスのゲノムの分子数(ウイルス粒子数)を表すものであり、アデノ随伴ウイルスベクターの量を示すものとして当業者には周知である。その数値は、精製したアデノ随伴ウイルス溶液を希釈してドットプロットハイブリダイゼーションを行ない、そのシグナル強度を所定の分子数のプラスミドDNAと比較することにより決定することができる。

【0029】

本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、一旦被験者に投与すると、比較的長期間にわたってアルツハイマー病の治療作用が持続する。特に、上記の量で経口投与した場合には、腸管上皮細胞において抗原が少なくとも6ヶ月以上提示され、これに対する抗体産生が誘導されることが確認されている。この点に鑑み、当業者であれば適切な投薬計画を作成することができる。

【0030】

本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、これを含む医薬組成物として被験者に投与することができる。従って、本発明によれば、本発明によるアデノ随

伴ウィルスベクターを含んでなる、アルツハイマー病を治療するための医薬組成物が提供される。本発明の好ましい実施形態によれば、この医薬組成物は経口投与のためのものとされる。

【0031】

本発明による医薬組成物は、その投与経路および剤型に応じて、当技術分野において公知の方法により調製することができる。例えば、経口投与のための医薬組成物としては、カプセル剤、溶液剤等の剤型が使用可能である。従って、本発明による医薬組成物は、それぞれの剤型に応じて、医薬上許容される担体、希釈剤、保存剤等を含むことができる。

【0032】

【実施例】

以下、本発明を実施例によってより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。なお、以下の試験例で用いるマウスは、アルツハイマー病のモデルマウスのAPPトランスジェニックマウス(Tg2576, Taconic社、Mayo Clinic)である。

【0033】

実施例1

APP シグナル配列 + A β 1-43 cDNAを発現するアデノ随伴ウィルスベクターの構築

アミロイド β 1-43(A β 1-43) cDNAは、ヒトアミロイド前駆タンパク質(APP) 遺伝子を鋳型として以下のプライマーを用いるPCRにて増幅した。PCR反応液の組成は、TAPS緩衝液(25mM、pH9.3)、KCl(50mM)、MgCl₂(2mM)、2-メルカプトエタノール(1mM)、dNTPs(100 μ M)、鋳型DNA(50~100ng)、およびプライマー(各0.2 μ M)とした。サイクル反応の温度条件は、94℃で30秒間、68℃で1分間、および72℃で3分間を1サイクルとし、これを30サイクルとした。

【0034】

プライマー

フォワード : 5'-GATGCAGAATTCCGACATGACTCAGGA-3' (配列番号 11) ; および
リバーズ : 5'-GTCTTAAGTCGCTATGACAACACCGCCC-3' (配列番号 12 : 3' に AflIII
部位を有する)。

【0035】

A P P の分泌シグナルである N 末の最初のシグナル配列 (配列番号 10) のアダプターは、以下の 2 つのオリゴヌクレオチドを 90℃ で 3 分間処理後、室温でアニーリングさせることにより作製した。

【0036】

オリゴヌクレオチド

センス : 5'-GGTCTAGAATGCTGCCCGGTTTGGCACTGCTCCTGCTGGCCGCCTGGACGGCTCGGGCGCT
T-3' (配列番号 13) ;

アンチセンス : 5'-AGCGCCCCGAGCCGTCCAGGCGGCCAGCAGGAGCAGTGCCAAACCGGGCAGCATTC
TAGACC-3' (配列番号 14)。

【0037】

A P P の分泌シグナルアダプター (センス鎖の 3' 側に突出した T 残基を持つ) と P C R で増幅した A β 1-43 cDNA (アンチセンス鎖の 3' 側に突出した A 残基を持つ) を結合し、これを鋳型として以下のプライマーを用いて P C R を行い、A P P シグナル配列を A β 1-43 cDNA の 5' 側に結合させた融合遺伝子 : A P P シグナル配列 + A β 1-43 cDNA (配列番号 7 : この配列中の第 3 ~ 8 ヌクレオチドは X b a I 認識部位である) を作製した。P C R 反応液の組成は、T A P S 緩衝液 (25 mM、pH 9.3)、K C l (50 mM)、M g C l ₂ (2 mM)、2-メルカプトエタノール (1 mM)、d N T P s (100 μ M)、鋳型 DNA (50 ~ 100 ng)、およびプライマー (各 0.2 μ M) とした。サイクル反応の温度条件は、94℃ で 30 秒間、68℃ で 1 分間、および 72℃ で 3 分間を 1 サイクルとし、これを 30 サイクルとした。

【0038】

プライマー

フォワード : 5'-GGTCTAGAATGCTGCCCGGTTTGGCAC-3' (配列番号 15 : 5' 側に X b a I 部位を有する) ;

リバーズ :5'-GTCTTAAGTCGCTATGACAACACCGCCC-3' (配列番号 12 :5' 側に A f l I I 部位を有する)。

【0039】

効率よくアデノ随伴ウイルスの DNA パッケージングを得るには、適度な長さ (4 ~ 4.5 k b p) の DNA が必要であるので、A P P シグナル配列 + A β 1-43 c D N A (X b a I - A f l I I / b l u n t) に、非機能的な "stuffer" DNA として p B R 3 2 2 プラスミド DNA の P v u I I - S a l I 断片を結合させ、標準的なアデノ随伴ウイルスベクター (p X X U F 1) の X b a I - S a l I 部位に組み込んだ。

【0040】

さらに、上記の組換え p X X U F 1、ならびに標準的な R e p / C a p プラスミド、および E 2 A / E 4 / V A プラスミドの 3 種類のベクターを H E K 2 9 3 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、H E K 2 9 3 細胞を大量培養後、細胞溶解物からウイルス粒子を C s C l の超遠心により精製して、A P P シグナル配列 + A β 1-43 c D N A を有するアデノ随伴ウイルスベクターを得た。

【0041】

実施例 2

A P P シグナル配列 + A β 1-21 c D N A を発現するアデノ随伴ウイルスベクターの構築

A P P シグナル配列 + A β 1-43 c D N A (X b a I - A f l I I / b l u n t) を p B l u e s c r i p t プラスミド (X b a I - S m a I) に組み込んだ。これを鋳型として、以下のプライマーを用いて P C R を行った。

【0042】

プライマー

フォワード :5'-TGGCGGCCGCTCTAGAATG-3' (配列番号 16 :5' 側に N o t I 部位を有する) ;

リバーズ :5'-CACATCTTAAGCAAAGAACACC-3' (配列番号 17) 。

【0043】

A P P シグナル配列 + A β 1-21 c D N A (配列番号 9 : この配列中の第 3

～10ヌクレオチドはNot I 認識部位であり、第11～16ヌクレオチドはXba I 認識部位である) のPCR産物を、Not I-Afl II/blunt 処理し、上記の"stuffer" pBR322 Pvu II-Sa I 断片とともにpXXUF1(Not I-Sa I)に組み込んだ。

【0044】

さらに、実施例1と同様にして、APPシグナル配列+A β 1-21cDNAを有するアデノ随伴ウイルスベクターを得た。

【0045】

比較例1

コントロールとして、GFP グリーン蛍光タンパク質)を発現するアデノ随伴ウイルス (GFP rAAV)を作製した。

【0046】

試験例1

ウェスタンブロット解析

APPシグナル配列+A β 1-43cDNAを発現ベクターpXXUF1に組み込み、lipofectamine 2000(Invitrogen)を用いてHEK293細胞へ導入した48時間後に培養上清と細胞溶解物を抽出し、それぞれ抗A β 抗体(4G8)で免疫沈降後、SDS-PAGEゲルに電気泳動した。そして、ニトロセルロース膜に蛋白を転写した後、抗A β 抗体によってA β 蛋白の検出を試みた。その結果、A β はオリゴマーを形成しながら細胞外に分泌されること、および細胞内では多量の4kDaのA β ペプチドモノマー蛋白が生成していることが確認された。

【0047】

試験例2

マウス血清の採取

15週齢のマウスに、実施例1のアデノ随伴ウイルスベクター 5×10^{11} viral genomeを1回のみ経口投与した。このマウスの血清を1ヶ月後、4ヶ月後、および6ヶ月後にそれぞれ採取した。

【0048】

マウス血清中の抗A β 抗体の検出

A β 1-42ペプチド(5mg/mL)を96ウェルプレート(Nunc, MaxiSorp[®]製)の各ウェルに付着させ、5% non-fat milk/TBS-T bufferでブロックした後、上記の採取したマウス血清を加え(500倍希釈)、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体で検出した。抗体価の評価は、ELISAリーダーでの吸光度測定により行った。その結果を図1に示す。

【0049】

血清中の抗体価は、主として経口投与後1ヶ月でピークを示し、6ヶ月後まで抗体の持続的産生を認めた。

【0050】

試験例3

マウス血清によるA β 凝集反応の阻害試験

A β 1-40ペプチドを120mMの濃度に調整し、37℃でインキュベーションした。24時間後にA β の凝集が開始するのが見られた。このA β の凝集物にマウスの血清を1:10および1:20(vol:vol)の濃度で加え、37℃で1週間インキュベーションした。A β 1-40の結合・凝集をマウスの血清が阻害するかどうか、2mMチオフラビン-Tを加え、分光蛍光計(445nmでの励起; 490nmでの発光)を用いて測定した。その結果を図2に示す。

【0051】

試験例1で示したアデノ随伴ウイルスベクター投与後6ヶ月のマウス血清は、コントロールのマウス血清と比べ、有意にin vitroでA β 1-40の凝集・結合を阻害した。

【0052】

試験例4

組織からのDNA抽出及びPCR

実施例Iのアデノ随伴ウイルスを経口投与した後、28週間のマウスより、心、肺、脾臓、肝臓、上部消化管および腎臓を摘出し、Tris溶液中で組織をホモジネートした後、プロテインアーゼKで蛋白を分解し、フェノール/クロロホルム処理し、DNAを精製した。次に、アデノ随伴ウイルスベクター(pXXUF1)の

プロモーター領域の5'側塩基配列とベクターの3'側塩基配列から以下のプライマーを作製し、PCRを行った。PCR反応液の組成は、TAPS緩衝液(25 mM、pH 9.3)、KCl(50 mM)、MgCl₂(2 mM)、2-メルカプトエタノール(1 mM)、dNTPs(100 μM)、鋳型DNA(50~100 ng)、およびプライマー(各0.2 μM)とした。サイクル反応の温度条件は、94℃で1分間、68℃で20秒間、および72℃で1分間を1サイクルとし、これを30サイクルとした。PCR産物を2%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロミドで染色した。

【0053】

プライマー

フォワード: 5'-AGTGAACCGTCAGATCGC-3' (配列番号18) ;

リバース: 5'-CGGTATCAGCTCACTCAA-3' (配列番号19)。

【0054】

目的とするPCR産物を示す500bpのバンドは、上部消化管組織のみに認められた。

【0055】

試験例5

マウス脾細胞のAβ1-42ペプチドに対する細胞増殖反応

実施例1のアデノ随伴ウイルスを経口投与した後28週間のマウスより脾細胞を分離し、96ウェルプレートの1ウェルあたり 5×10^4 細胞を加え、Aβ1-42ペプチドを各濃度で加えた培養液中で48時間培養した。細胞培養終了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。テトラゾリウム塩は、生細胞にのみ活性のあるミトコンドリアのコハク酸テトラゾリウム還元酵素によりホルマゼン色素に変換されるので、ELISAリーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。その結果を図3に示す。

【0056】

実施例1のアデノ随伴ウイルスを経口投与したマウスの脾細胞は、Aβ1-42ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。

【0057】

試験例 6組織染色試験 1

実施例 1 のアデノ随伴ウイルスを経口投与したマウス（以下「治療群」という）、または未処置の同齢マウス（以下「コントロール群」という）から、投与後 6 ヶ月（10 ヶ月齢）経過時に組織を得て、その組織の凍結切片を用いて以下の実験を行った。組織中の A β 蛋白や老人斑を検出するために、70%ギ酸で処理し、5% H₂O₂ で内因性のペルオキシダーゼ活性を失活させた。抗 A β 抗体（4G8:1000 倍希釈）またはラビット抗 A β 40 抗体（1000 倍希釈）と反応させた後、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を加え、DAB 染色を行った。

【0058】

コントロール群では、加齢と共にアミロイド沈着が進み、6 ヶ月齢では脳に軽度の沈着が認められ、10 ヶ月齢になるとアミロイド沈着は著明になり、老人斑の形成も認められ、神経細胞内のアミロイド沈着も散見された。

【0059】

一方、治療群では、投与後 6 ヶ月（10 ヶ月齢）に解剖したところ、上部消化管上皮細胞に A β 蛋白の発現が認められた。また、投与後 6 ヶ月の脳を解析すると、コントロール群に比べ明らかにアミロイド沈着が減少し、老人斑も激減していた。投与後 6 ヶ月の脳の矢状断面におけるアミロイド斑の数を計測した結果を表 1 に示す。

【0060】

【表 1】

表 1：マウスのコントロール群と治療群の脳のアミロイド沈着の比較

群	細胞内 アミロイド斑	細胞外 アミロイド斑
コントロール群	76	++
治療群	8	±

マウス：10 ヶ月齢

【0061】

コントロール群では、アミロイド斑数は平均 76 個であるのに対し、投与群で

は 8 個と約 90% 減少していた。コントロール群に散見された神経細胞内のアミロイド沈着は、治療群では殆ど認められなかった。

【0062】

試験例 7

組織染色試験 2

試験例 6 と同様に、治療群およびコントロール群から、投与後 6 ヶ月（10 ヶ月齢）経過時に組織を得て、その組織の凍結切片を用いて以下の実験を行った。抗 CD4 抗体、抗 CD86 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 GFAP 抗体（アストロサイト）、抗 Iba-1 抗体（ミクログリア）などの抗体を用いて凍結切片を ABC 法にて染色して、中枢神経系におけるリンパ球の浸潤の有無を確認した。その結果を表 2 に示す。

【0063】

【表 2】

表 2: 免疫組織染色

	コントロール群	治療群
CD4	(-)	(-)
CD86	(-)	(-)
CD11b	(-)	(-)
GFAP	(+)	(+)
Iba-1 (ミクログリア)	(+)	(++~+++)

【0064】

脳組織を T 細胞マーカーである CD4 および T 細胞活性化分子である CD86 でそれぞれ染色したところ、コントロール群および治療群とも陰性であった。末梢のマクローファージマーカーである CD11b についても陰性であった。アストロサイトマーカーである GFAP については、両群で差が認められなかった。治療群の前頭葉および側頭葉において、活性化したミクログリア (Iba-1 陽性) の増加が認められた。

【0065】

試験例 8組織染色試験 3

実施例 2 のアデノ随伴ウイルスを経口投与したマウス（以下「治療群 2」という）またはコントロール群から、投与後 6 ヶ月（10 ヶ月齢）経過時に組織を得て、その組織の凍結切片を用いて試験例 6 と同様に DAB 染色を行った。

【0066】

治療群 2 において、投与後 6 ヶ月（10 ヶ月齢）の脳を解析すると、コントロール群に比べ明らかにアミロイド沈着が減少し、老人斑も激減していた。

【0067】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> President of Chubu National Hospital

The Organization for Pharmaceutical Safety and Research

<120> A Recombinant Adeno-associated Virus Vector for
Treatment of Alzheimer's Disease

<130> 142136

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 129

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(129)

<400> 1

gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa 48

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

15

ttg gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att 96

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

gga ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca 129

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

35

40

<210> 2

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

35

40

<210> 3

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(63)

<400> 3

gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa 48

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

15

ttg gtg ttc ttt gca

63

Leu Val Phe Phe Ala

20

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala

20

<210> 5

<211> 54

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(54)

<400> 5

atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tgg acg gct cgg 48

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg

1

5

10

15

gcg ctt

54

Ala Leu

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg

1

5

10

15

Ala Leu

<210> 7

<211> 197

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA Construct

<220>

<221> CDS

<222> (9)..(191)

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(8) -

<223> Xba I recognition site

<220>

<221> sig_peptide

<222> (9)..(62)

<400> 7

ggtctaga atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tgg acg 50

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr

1

5

10

gct cgg gcg ctt gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt 98

Ala Arg Ala Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val

15

20

25

30

cat cat caa aaa ttg gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa 146

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys

s

35

40

45

ggt gca atc att gga ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg act 191

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

50

55

60

taagac

197

<210> 8

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg

1 5 10 15

Ala Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His

20 25 30

Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala

35 40 45

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

50 55 60

<210> 9

<211> 137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA Construct

<220>

<221> CDS

<222> (17)..(133)

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(10)

<223> Not I recognition site

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(16)

<223> Xba I recognition site

<220>

<221> sig_peptide

<222> (17)..(70)

<400> 9 .

tggcggccgc tctaga atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc 52

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala

1

5

10

tgg acg gct cgg gcg ctt gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat 100

Trp Thr Ala Arg Ala Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr

15

20

25

gaa gtt cat cat caa aaa ttg gtg ttc ttt gct taag

137

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala

30

35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 10

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15

Ala Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
20 25 30

Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
35

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 11

gatgcagaat tccgacatga ctcagga

27

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 12

gtcttaagtc gctatgacaa caccgccc

28

<210> 13

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Signal Sequence

Adaptor

<400> 13

ggtctagaat gctgcccggg ttggcactgc tcctgctggc cgcctggacg gctcgggcgc 60

tt

62

<210> 14

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Signal Sequence

Adaptor

<400> 14

agcgcccgag ccgtccaggc ggccagcagg agcagtgcc aaccgggcag cattctagac 60

c

61

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 15

ggctctagaat gctgcccggt ttggcac

27

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 16

tggcggccgc tctagaatg

19

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 17

cacatcttaa gcaaagaaca cc

22

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 18

agtgaaccgt cagatcgc

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 19

cggtatcagc tcactcaa

18

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、 $A\beta$ 1-43 を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを経口投与したマウスからの血清中の抗 $A\beta$ 抗体産生量を示す。

【図 2】

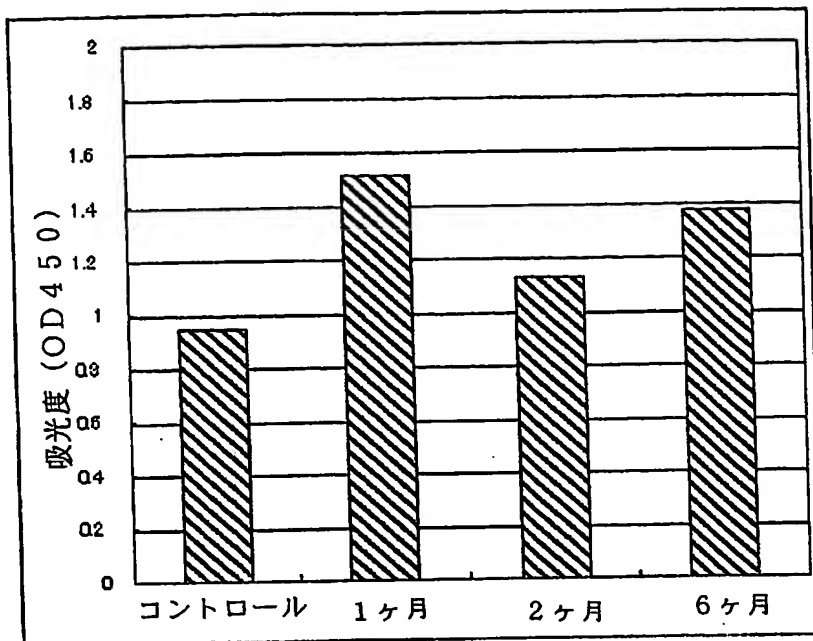
図 2 は、マウス血清中の抗 $A\beta$ 抗体による *in vitro* での $A\beta$ 凝集抑制効果を示す。

【図 3】

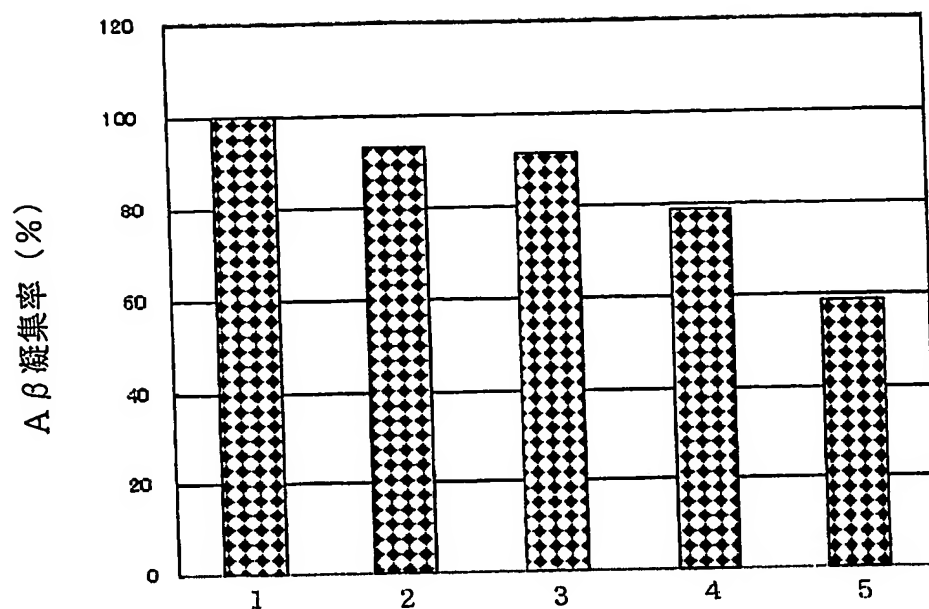
図 3 は、治療したマウスの脾細胞の $A\beta$ 42 ペプチドに対する細胞増殖反応性を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

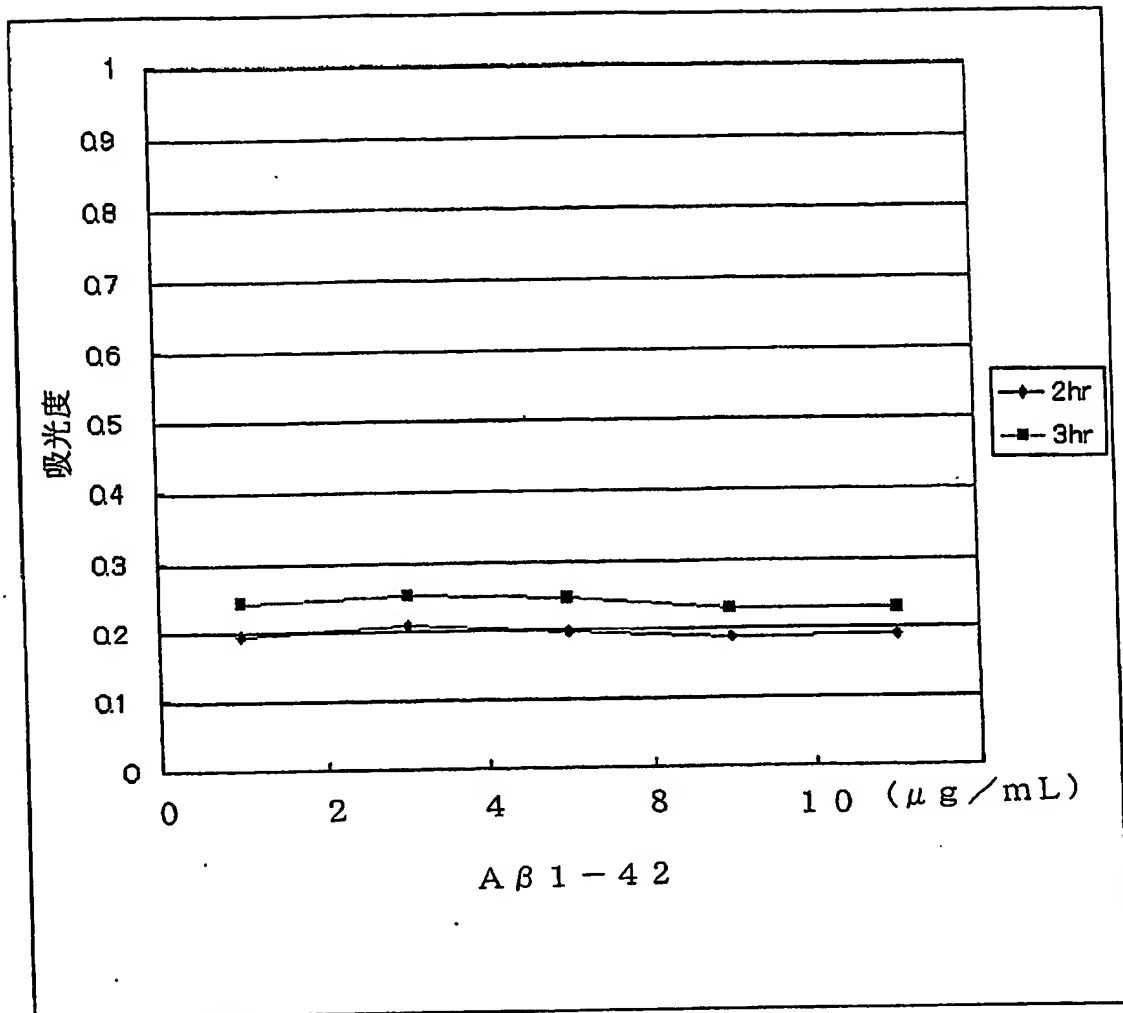


【図 2】



- 1 ; Aβのみ
2 ; Aβ : コントロール血清 = 1 : 20
3 ; Aβ : 治療群血清 = 1 : 20
4 ; Aβ : コントロール血清 = 1 : 10
5 ; Aβ : 治療群血清 = 1 : 10

【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 中枢神経系での老人斑の形成およびアミロイドの沈着を抑制し、かつ脳炎、肝障害などの副作用を起こさない、安全性の高いアルツハイマー病の治療剤の提供。

【解決手段】 β アミロイドペプチドの液性免疫惹起部位を含むペプチド断片を発現しうるアデノ随伴ウイルスベクターであって、このペプチド断片をコードするDNAを機能しうる形で含んでなる、アデノ随伴ウイルスベクターを使用する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号 特願 2003-169714
受付番号 50300996625
書類名 特許願
担当官 笹川 友子 9482
作成日 平成 15 年 6 月 17 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 501304319
【住所又は居所】 愛知県大府市森岡町源吾 36 の 3
【氏名又は名称】 国立療養所中部病院長

【特許出願人】

【識別番号】 598004952
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 3 丁目 3 番 2 号 新霞が関ビル 9 階

【氏名又は名称】 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構

【代理人】

申請人

【識別番号】 100075812
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3-2-3 協和特許法律事務所

【氏名又は名称】 吉武 賢次

【選任した代理人】

【識別番号】 100094640
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3-2-3 富士ビル 協和特許法律事務所

【氏名又は名称】 紺野 昭男

【選任した代理人】

【識別番号】 100107342
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 協和特許法律事務所

【氏名又は名称】 横田 修孝

【選任した代理人】

【識別番号】 100091487
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 協和特許法律事務所

次頁有

認定・付加情報 (続き)

【氏名又は名称】 中村 行孝

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【整理番号】 14213688
【提出日】 平成16年 6月 3日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-169714
【承継人】
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関3丁目3番2号 新霞が関ビル
【氏名又は名称】 独立行政法人医薬品医療機器総合機構
【承継人代理人】
【識別番号】 100075812
【弁理士】
【氏名又は名称】 吉 武 賢 次
【選任した代理人】
【識別番号】 100091487
【弁理士】
【氏名又は名称】 中 村 行 孝
【選任した代理人】
【識別番号】 100094640
【弁理士】
【氏名又は名称】 紺 野 昭 男
【選任した代理人】
【識別番号】 100107342
【弁理士】
【氏名又は名称】 横 田 修 孝
【その他】 独立行政法人医薬品医療機器総合機構法 (平成14年12月20日法律第192号) 附則第13条第1項に基づく承継
【提出物件の目録】
【物件名】 委任状 1
【援用の表示】 特願 2002-162967

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-169714
受付番号	50400932055
書類名	出願人名義変更届 (一般承継)
担当官	笹川 友子 9482
作成日	平成 16 年 7 月 5 日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	504137945
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 3-3-2
【氏名又は名称】	独立行政法人医薬品医療機器総合機構

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100075812
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内 3-2-3 協和特許法律事務所
----------	----------------------------

【氏名又は名称】	吉武 賢次
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100091487
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 協和特許法律事務所
----------	-----------------------------------

【氏名又は名称】	中村 行孝
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100094640
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内 3-2-3 富士ビル 協和特許法律事務所
----------	---------------------------------

【氏名又は名称】	紺野 昭男
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100107342
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 協和特許法律事務所
----------	-----------------------------------

【氏名又は名称】	横田 修孝
----------	-------

特願 2003-169714

出願人履歴情報

識別番号 [501304319]

1. 変更年月日 2001年 7月31日
[変更理由] 新規登録
住所 愛知県大府市森岡町源吾36の3
氏名 国立療養所中部病院長
2. 変更年月日 2004年 5月28日
[変更理由] 名称変更
住所 愛知県大府市森岡町源吾36の3
氏名 国立長寿医療センター総長

特願 2003-169714

出願人履歴情報

識別番号

[598004952]

1. 変更年月日

1997年12月17日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都千代田区霞が関3丁目3番2号 新霞が関ビル9階

氏名

医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構

2. 変更年月日

2004年 3月 2日

[変更理由]

住所変更

住所

東京都千代田区霞が関3丁目3番2号 新霞が関ビル10階

氏名

医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構

特願 2 0 0 3 - 1 6 9 7 1 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 4 1 3 7 9 4 5]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 4 月 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 3 - 3 - 2

氏 名

独立行政法人医薬品医療機器総合機構